

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/86, C07K 14/02, C12N 5/08, 5/10, A61K 48/00, 39/29	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35797 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. November 1996 (14.11.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00807 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1996 (09.05.96) (30) Prioritätsdaten: 195 17 532.8 12. Mai 1995 (12.05.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFSCHEIDER, Peter [DE/DE]; Nördl. Auffahrtsallee 65, D-80368 München (DE). HABENBERGER, Peter [DE/DE]; Margaretenplatz 5, D-81373 München (DE). WEISS, Ludwig [DE/DE]; Münchnerstrasse 20, D-86438 Kissing (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: HBV VECTORS AND CELLS FOR PRODUCING THE SAME (54) Bezeichnung: HBV-VEKTOREN UND ZELLEN ZU IHRER BEREITSTELLUNG (57) Abstract An HBV vector is disclosed in which HBV functional genes are at least partially deleted. Also disclosed are a process for producing such a HBV vector and cells that may be used for that purpose. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft einen HBV-Vektor, bei dem funktionelle Gene von HBV zumindest teilweise deletiert sind. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung eines solchen HBV-Vektors sowie hierfür verwendbare Zellen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

WO96/35797

PCT/DE96/00807

HBV Vectors and Cells for Their Preparation

The invention relates to HBV vectors, methods for their preparation, and cells that can be used for the purpose, as well as the use of HBV vectors.

Efficient methods are required for gene therapy to transfer a "therapeutic" DNA to selected target organs. In the past, retroviral vectors in particular have been used for the purpose which, however, have the disadvantage that the cells to be treated must first be propagated in vitro, infected, and then returned to the patients. The goal of gene therapy however should be the treatment of cells in situ.

The strict organ specificity of the vector system employed is an absolute requirement for gene therapy in vivo. The hepatocytes of the liver are especially important in this regard. The liver is the source of most serum proteins and plays a central role in the regulation of metabolism in the peripheral organs. For this reason, many different hereditary metabolic defects become manifested in the liver. In addition, the liver is also affected by several virus infections that are difficult to treat. Moreover, the liver, assuming a suitable gene transfer system, could be used as a bioreactor for secreting various proteins. This would allow new approaches to be taken in the treatment of diseases that are not manifested in the liver.

A liver-cell-specific gene transfer system that could be used in vivo does not yet exist however.

Hence, the goal of the present invention is to create a gene transfer system that is liver-cell-specific and is suitable for in vivo gene therapy.

This is achieved according to the invention by the subjects in the claims.

The subject of the present invention is therefore an HBV vector in which functional HBV genes are at least partially deleted.

The term "HBV" indicates hepatitis B virus. This is a DNA virus with a genome length of 3.2 kb. The genome of hepatitis B virus contains four partially overlapping open reading frames (ORF): the Pol-ORF (HBV polymerase), the S-ORFs (surface proteins), the C-ORFs (capsid proteins), and the X-ORF (viral transactivator). Hepatitis B virus is liver-cell-specific.

The term "HBV vector" includes any HBV vector which is suitable for a gene transfer, especially in a gene therapy and very specifically a gene therapy in vivo. The term "vector" therefore applies to a DNA molecule as well as a virus particle.

The expression "at least partially deleted in the functional gene of HBV" indicates that one to all genes in an HBV vector according to the invention that are required for replication of HBV are partially or completely deleted. Such genes are particularly those which code for HBV polymerase, surface proteins, and capsid proteins. As a result of the above deletion, an HBV vector according to the invention can no longer replicate independently in a eukaryotic cell.

It is advantageous when, in an HBV vector according to the invention, the genes for the polymerase, surface proteins, and capsid proteins of HBV are at least partially deleted. It is especially advantageous if these genes are completely deleted.

It is also advantageous when, in an HBV vector according to the invention, the gene of the HBV transactivator is mutated or partially or completely deleted.

A preferred HBV vector of the present invention is pHBV/V1. Its DNA sequence is shown in Figure 1. In pHBV/V1, the genes for the HBV polymerase, surface proteins, and capsid proteins are completely deleted. Similarly, the gene for the transactivator of HBV shows an ochre mutation. pHBV/V1 was deposited with the DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) under DSM 9947 on May 3, 1995.

In an HBV vector according to the invention, because of its deletion, a foreign DNA can be inserted and then expressed in the cells that accept the HBV vector. A foreign DNA can be any DNA, especially a diagnostically and/or therapeutically effective gene. The length of the foreign DNA can vary but it is advantageous for it not to exceed 3 kb. This length corresponds on the protein level to a molecular weight of more than 100,000, which is sufficient for gene therapy applications.

The insertion of a foreign DNA into a HBV vector according to the invention takes place through the multiple cloning site of the latter. Thus, it is also possible to insert the foreign DNA between two inverse terminal repetitions of adeno-associated viruses. This would increase the integration frequency as well as the integration specificity of the foreign DNA in a special chromosome.

Another subject of the present invention is a method for preparing the above HBV vectors. In such a method, the defect in the independent replication of an HBV vector according to the invention is overcome with this vector being transfected into cells that express functional HBV proteins. The expression of the HBV proteins can be transient and/or stable with a stable expression being preferred. With the method according to the invention, HBV vectors are prepared as DNA molecules as well as virus particles.

To produce the above cells, conventional methods may be employed. It is advisable to transfect hepatoma cells, for example H p G2 cells (see Knowles, B.B. et al., Science 209, (1980), 497-499), with expression plasmids that code for

functional HBV proteins. It is especially favorable if the genes for the individual functional HBV proteins are on different expression plasmids.

To produce the above expression plasmids, it has been found to be favorable to use conventional HBV vectors that have selection markers and delete in them the epsilon region required for packaging as well as to delete various functional HBV genes. The DNA sequence of HBV, including the epsilon region, is known (see for example Fujiyama, A. et al., Nucl. Acids Res. 13, (1983), 4601-4610; Polack, J.R. and Ganem, D., J. Virol. 67, (1993), 3254-3263).

For the transfection of hepatoma cells, for example Hep G2 cells with the above expression plasmids, conventional methods may be employed. For a transient expression of the functional HBV proteins, a DEAE dextran method for example is suitable (see McCutchan, J.H. and Pagano, J.S., J. Natl. Cancer Inst. 41, (1968), 351-357) while for a stable expression a calcium phosphate precipitation method for example can be used (see Graham, F.L. and van der Eb, A.J., Virology, 52 (1973), 456-467). Cells are contained that express the functional HBV proteins. Such cells are likewise a subject of the present invention. Of these, the preferred cells are those which express the polymerase, the surface antigens, and the capsid proteins of HBV; especially those which express them stably.

The present invention provides a gene transfer system that is liver-cell-specific and is suitable for gene therapy, especially in vivo gene therapy. The gene transfer system comprises HBV vectors and cells in which these vectors can be prepared.

The present invention makes it possible to transfer foreign DNA into liver cells and express it there. This makes it possible to treat not only monogenic metabolic defects, for example familial hypercholesterinemia, hyperammonemia, hyperbilirubinemia, phenylketonuria, α_1 -antitrypsin deficiency, hemophilia, etc.,

but also multifactorial diseases such as viral hepatitis, for example HBV, HCV, HDV, and last but not least primary hepatocellular carcinoma.

The present invention also makes it possible to use the liver as a bioreactor for secreting any therapeutic proteins into the blood. This lends new aspects to gene therapy that go far beyond the original target organ, such as for example the treatment of malignant diseases, viral infections, or in general diseases that do not manifest themselves in the liver.

It is also possible with the present invention to monitor a wide variety of methods for killing viruses in fluids removed from the body such as blood. In this case, an HBV vector provided with a Minotor gene can be added to the body fluid before the method begins and then determined at certain time intervals.

The present invention is therefore best suited as a reagent for diagnosis and/or therapy.

Brief Description of the Drawing

The figure shows the DNA sequence of an HBV vector according to the invention, pHBV/V1. This DNA sequence comprises the following:

Nucleotide No.	Elements
3262-3272	direct repeat II of HBV
3496-3504	direct repeat I of HBV
3519-3579	epsilon region of HBV
3694-3748	multiple cloning site
3962-3970	direct repeat II of HBV
4196-4204	direct repeat I of HBV
4288-4293	poly A region

The remaining nucleotides comprise those of the cloning vector pSPT 19 (see Example 1).

The following examples explain the invention.

Example 1: Construction of an HBV vector according to the invention, pHBV/V1

From the plasmid pBRHBadr4 (see Fujiyama, A. et al., above) which contains an HBV subtype, adr 4, a 621 bp long BamHI/Stu I fragment of adr 4 was cut out and inserted into the cloning vector pSPT 19 opened with BamHI/Sma I (see catalog from Boehringer Mannheim, Order No. 909815). The plasmid pSPT 0.2x HBV was obtained. This plasmid contains all the regulatory elements of the E_H/C_P region required for HBV replication. In pSPT 0.2x HBV, at the BamHI restriction location, a complete 3215 bp long HBV genome (BamHI/BamHI fragment) of pBRHBadr4 (see above) was inserted. Plasmid pSPT 1.2x HBV was obtained. In this plasmid, the above regulatory elements of the E_H/C_P region are located at the 5' end and also at the 3' end of the HBV part. In addition, in the X-ORF (see above) of pSPT 1.2x HBV, an ochre mutation was added in codon 8. The plasmid pSPT 1.2x HBV Mx was obtained. This plasmid was split with StuI and NcoI (interfaces in the HBV genome) and the functional genes of HBV were removed. Instead, a multiple cloning site was added. An HBV vector pHBV/V1 according to the invention was obtained.

Example 2: Expression of a foreign DNA in an HBV vector, pHBV/V1 according to the invention

A known foreign DNA was inserted into the multiple cloning site of pHBV/V1 of Example 1. This was the luciferase gene or the LacZ gene fragment. In the former case, the plasmid pV1/HBV-Luc and in the second, the plasmid pV1/HBV-

LacZ was obtained. Both plasmids were used for a transient transfection of HepG2 cells (see above).

It was shown that both foreign DNAs were expressed. This is also an indication of the replication of pHB/V1 in cells that produce HBV-WT particles.

WO96/35797

PCT/DE96/00807

Claims

1. HBV vector in which functional genes of HBV are at least partially deleted.
2. HBV vector according to Claim 1 characterized in that the gene for the transactivator of HBV mutates or is partially or completely deleted.
3. HBV vector according to Claim 1 or 2 characterized in that the genes for the HBV polymerase, surface proteins, and capsid proteins are deleted and the gene for the transactivator of HBV is mutated.
4. HBV vector according to Claim 3 deposited with the DSM under DSM 9947.
5. Method for creating an HBV vector according to Claim 3 comprising the following method steps:
 - (a) Transfection of cells with the HBV vector according to Claim 3 with the cells expressing the HBV polymerase, surface proteins, and capsid proteins, and
 - (b) Isolation of the HBV vector contained in (a).
6. Cells expressing the HBV polymerase, surface proteins, and capsid proteins.
7. Use of the HBV vector according to Claim 1 as a reagent for diagnosis and/or therapy.

8. Use according to Claim 7 with the therapy being an in vivo gene therapy.

Fig. 1

1 TATAGTGTCA CCTAAATCGT ATGTGTATGA TACATAAGGT TATGTATTAA
51 TTGTAGCCGC GTTCTAACGA CAATATGTAC AAGCCTAATT GTGTAGCATC
101 TGGCTTACTG AAGCAGACCC TATCATCTCT CTCGTAAACT GCCGTCAGAG
151 TCGGTTTGGT TGGACGAACC TTCTGAGTTT CTGGTAACGC CGTCCCGCAC
201 CCGGAAATGG TCAGCGAACC AATCAGCAGG GTCATCGCTA GCCAGATCCT
251 CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCGGCATCAC CGGCGCCACA GGTGCGGTTG
301 CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG GGAAGATCG GGCTCGCCAC
351 TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCGGCGTG GGTATGGTGG CAGGCCCCGTG
401 GCCGGGGGAC TGTTGGGCGC CATCTCCTTG CATGCACCAT TCCTTGCGGC
451 GGCGGTGCTC AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC CTAATGCAGG
501 AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CGATATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT
551 CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
601 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT
651 GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA
701 AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT
751 GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA
801 TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT
851 ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA
901 AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT
951 TGCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG
1001 TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
1051 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAAGTTTT
1101 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC
1151 GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG
1201 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG
1251 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA
1301 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
1351 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
1401 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC
1451 CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACTGG CGAACTACTT
1501 ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT
1551 TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG

1601 ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG
1651 GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG
1701 TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT
1751 CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT
1801 TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT
1851 CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC
1901 ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT
1951 TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC
2001 AGCGGTGGTT TGTTCGCCG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG
2051 TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG
2101 CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT
2151 CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT
2201 GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GCGCAGCGG
2251 TCGGGCTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC
2301 CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC
2351 TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAAGCG CAGGGTCGGA
2401 ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA
2451 TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT
2501 GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT
2551 TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC
2601 GTTATCCCTT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG
2651 ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG
2701 GAAGCGGAAG AGCGCCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG
2751 TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC TCTGATGCCG
2801 CATAGTTAAG CCAGTATATA CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT
2851 GGCTGCGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT
2901 GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC
2951 TGCATGTGTC AGAGGTTTTT ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCCAG
3001 CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGAGACC CAAGCTTGCA
3051 TGCCTGCAGG TCGACTCTAG AGGATCCTGC GCGGCACGTC CTTTGTCTAC
3101 GTCCCGTCGG CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCGTCTCGGG GCCGTTTGGG
3151 ACTCTACCGT CCCCTTCTTC ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGCGCA
3201 CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC CTTCTCATCT GCCGGTCCGT

3251 GTGCACTTCG CTTACCTCT GCACGTCGCA TGGAGACCAC CGTGAACGCC
3301 CACCAGGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC
3351 GATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAGG
3401 ACTGGGAGGA GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTACTAGGA
3451 GGCTGTAGGC ATAAATTGGT CTGTTACCA GCACCATGCA ACTTTTTCAC
3501 CTCTGCCTAA TCATCTCATG TTCATGTCCT ACTGTTCAAG CCTCCAAGCT
3551 GTGCCTTGGG TGGCTTTGGG GCATGGACAT TGACCCGTAT AAAGAATTG
3601 GAGCTTCTGT GGAGTTACTC TCTTTTTTGC CTTCTGACTT CTTTCCTTCT
3651 ATTCGAGATC TCCTCGACAC CGCCTCAGCT CTATATCGGG AGGcctgcgg
3701 ccgctcgagt taactagtcg cgatgcatcg atgatcaccg gggccatgGC
3751 TGCTAGGGTG TGCTGCCAAC TGGATCCTGC GCGGGACGTC CTTTGTCTAC
3801 GTCCCGTCGG CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCGTCTCGGG GCCGTTTGGG
3851 ACTCTACCGT CCCCTTCTTC ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGCGCA
3901 CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC CTTCTCATCT GCCGGTCCGT
3951 GTGCACTTCG CTTACCTCT GCACGTCGCA TGGAGACCAC CGTGAACGCC
4001 CACCAGGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC
4051 GATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAGG
4101 ACTGGGAGGA GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTACTAGGA
4151 GGCTGTAGGC ATAAATTGGT CTGTTACCA GCACCATGCA ACTTTTTCAC
4201 CTCTGCCTAA TCATCTCATG TTCATGTCCT ACTGTTCAAG CCTCCAAGCT
4251 GTGCCTTGGG TGGCTTTGGG GCATGGACAT TGACCCGTAT AAAGAATTG
4301 GAGCTTCTGT GGAGTTACTC TCTTTTTTGC CTTCTGACTT CTTTCCTTCT
4351 ATTCGAGATC TCCTCGACAC CGCCTCAGCT CTATATCGGG AGGGGGTACC
4401 GAGCTCGAAT TCCGTGTATT C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/00807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C07K14/02 C12N5/08 C12N5/10 A61K48/00
A61K39/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 16420 (GEN HOSPITAL CORP) 31 October 1991	1,6,7
Y	see the whole document	2-5
X	WO,A,90 02176 (UNIV YALE ;FOX CHASE CANCER CENTER (US)) 8 March 1990 see the whole document	1
Y	J MED VIROL, MAR 1995, 45 (3) P247-52, UNITED STATES, XP002009355 UCHIDA T ET AL: "Complete nucleotide sequences and the characteristics of two hepatitis B virus mutants causing serologically negative acute or chronic hepatitis B." see the whole document	2-5
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 1996

Date of mailing of the international search report

09. 08. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/00807

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>VIROLOGY, NOV 15 1994, 205 (1) P314-20, UNITED STATES, XP002009356 SUGATA F ET AL: "Analysis of the X gene promoter of woodchuck hepatitis virus." see the whole document -----</p>	2-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE96/00807

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 8 and 7 in part - in so far as they pertain to an in vivo procedure - relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out, based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116420	31-10-91	AU-B- 656136	27-01-95
		AU-B- 7785891	11-11-91
		CA-A- 2081022	21-10-91
		EP-A- 0528903	03-03-93

WO-A-9002176	08-03-90	AU-B- 4315689	23-03-90
		EP-A- 0380656	08-08-90



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, C07K 14/02, C12N 5/08, 5/10, A61K 48/00, 39/29</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35797</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. November 1996 (14.11.96)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 45%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00807</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1996 (09.05.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 17 532.8 12. Mai 1995 (12.05.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFSCHEIDER, Peter [DE/DE]; Nördl. Auffahrtsallee 65, D-80368 München (DE). HABENBERGER, Peter [DE/DE]; Margaretenplatz 5, D-81373 München (DE). WEISS, Ludwig [DE/DE]; Münchnerstrasse 20, D-86438 Kissing (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p> </td> <td style="width: 55%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00807</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1996 (09.05.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 17 532.8 12. Mai 1995 (12.05.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFSCHEIDER, Peter [DE/DE]; Nördl. Auffahrtsallee 65, D-80368 München (DE). HABENBERGER, Peter [DE/DE]; Margaretenplatz 5, D-81373 München (DE). WEISS, Ludwig [DE/DE]; Münchnerstrasse 20, D-86438 Kissing (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00807</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1996 (09.05.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 17 532.8 12. Mai 1995 (12.05.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFSCHEIDER, Peter [DE/DE]; Nördl. Auffahrtsallee 65, D-80368 München (DE). HABENBERGER, Peter [DE/DE]; Margaretenplatz 5, D-81373 München (DE). WEISS, Ludwig [DE/DE]; Münchnerstrasse 20, D-86438 Kissing (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: HBV VECTORS AND CELLS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54) Bezeichnung: HBV-VEKTOREN UND ZELLEN ZU IHRER BEREITSTELLUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An HBV vector is disclosed in which HBV functional genes are at least partially deleted. Also disclosed are a process for producing such a HBV vector and cells that may be used for that purpose.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft einen HBV-Vektor, bei dem funktionelle Gene von HBV zumindest teilweise deletiert sind. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung eines solchen HBV-Vektors sowie hierfür verwendbare Zellen.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

HBV-Vektoren und Zellen zu ihrer Bereitstellung

Die Erfindung betrifft HBV-Vektoren, Verfahren zu ihrer Bereitstellung und hierfür verwendbare Zellen sowie die Verwendung der HBV-Vektoren.

Für eine Gentherapie werden effiziente Verfahren benötigt, um eine "therapeutische" DNA in ausgewählte Zielorgane zu überführen. Bislang werden hierzu vor allem retrovirale Vektoren verwendet, die jedoch den Nachteil besitzen, daß die zu behandelnden Zellen zuerst in vitro propagiert, infiziert und dann wieder in den Patienten zurückgebracht werden müssen. Ziel einer Gentherapie sollte jedoch die Behandlung von Zellen in situ sein.

Für eine Gentherapie in vivo ist die strikte Organspezifität des eingesetzten Vektorsystems unbedingte Voraussetzung. Von besonderem Interesse sind hierfür die Hepatozyten der Leber. Die Leber ist die Quelle der meisten Serumproteine und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels in den peripheren Organen. Deshalb manifestiert sich in der Leber auch eine Vielzahl verschiedener, erblich bedingter Stoffwechseldefekte. Darüberhinaus ist die Leber auch bei einigen, nur sehr schlecht therapierbaren Virusinfektionen betroffen. Des weiteren könnte die Leber, vorausgesetzt, es gäbe ein geeignetes Gentransfersystem, als Bioreaktor zur Sezernierung verschiedenster Proteine benutzt werden. Damit könnten auch bei der Therapie von Erkrankungen, die sich nicht in der Leber manifestieren, neue Wege beschritten werden.

Ein leberzellspezifisches Gentransfersystem, für das eine Anwendung in vivo in Betracht käme, gibt es allerdings bisher nicht.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Gentransfersy-

stem bereitzustellen, das leberzellspezifisch ist und für eine in vivo Gentherapie geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein HBV-Vektor, bei dem funktionelle Gene von HBV zumindest teilweise deletiert sind.

Der Ausdruck "HBV" weist auf Hepatitis B Virus hin. Dies ist ein DNA-Virus mit einer Genomlänge von 3.2 kb. Das Genom von Hepatitis B Virus enthält vier teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF): den Pol-ORF (HBV-Polymerase), die S-ORFs (Oberflächenproteine), die C-ORFs (Capsidproteine) und den X-ORF (viraler Transaktivator). Hepatitis B Virus ist leberzellspezifisch.

Der Ausdruck "HBV-Vektor" umfaßt jeglichen HBV-Vektor, der sich für einen Gentransfer, besonders bei einer Gentherapie, ganz besonders bei einer in vivo Gentherapie eignet. Der Ausdruck "Vektor" betrifft dabei ein DNA-Molekül wie auch ein Viruspartikel.

Der Ausdruck "bei dem funktionelle Gene von HBV zumindest teilweise deletiert sind" weist darauf hin, daß in einem erfindungsgemäßen HBV-Vektor ein bis alle Gene, die zur Replikation von HBV notwendig sind, teilweise oder vollständig deletiert sind. Solche Gene sind insbesondere jene, die für die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV codieren. Aufgrund vorstehender Deletion kann sich ein erfindungsgemäßer HBV-Vektor in einer eukaryotischen Zelle nicht mehr selbständig replizieren.

Vorteilhaft ist es, wenn in einem erfindungsgemäßen HBV-Vektor die Gene für die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV zumindest teilweise deletiert sind. Besonders vorteilhaft ist es, wenn diese Gene vollständig deletiert sind.

Weiterhin ist es von Vorteil, wenn in einem erfindungsgemäßen HBV-Vektor auch das Gen des Transaktivators von HBV mutiert oder teilweise bzw. vollständig deletiert ist.

Ein bevorzugter HBV-Vektor der vorliegenden Erfindung ist pHBV/V1. Seine DNA-Sequenz ist in Fig. 1 angegeben. In pHBV/V1 sind die Gene für die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV vollständig deletiert. Ebenso weist das Gen für den Transaktivator von HBV eine ochre Mutation auf. pHBV/V1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 9947 am 3. Mai 1995 hinterlegt.

In einem erfindungsgemäßen HBV-Vektor kann aufgrund seiner Deletion eine Fremd-DNA inseriert und diese dann in den Zellen, die den HBV-Vektor aufnehmen, exprimiert werden. Eine Fremd-DNA kann jegliche DNA, insbesondere ein diagnostisch und/oder therapeutisch wirksames Gen sein. Die Länge der Fremd-DNA kann variieren, wobei es vorteilhaft ist, wenn sie etwa 3 kb nicht übersteigt. Diese Länge entspricht auf Proteinebene einem Molekulargewicht von mehr als 100000, was für gentherapeutische Anwendungen gut ausreicht.

Die Insertion einer Fremd-DNA in einen erfindungsgemäßen HBV-Vektor erfolgt über die "multiple cloning site" des letzteren. Damit ist es auch möglich, die Fremd-DNA zwischen zwei inverse terminale Repetitionen von Adeno-assoziierten Viren zu inserieren. Dies würde die Integrationsfrequenz sowie die Integrationspezifität der Fremd-DNA in einem speziellen Chromosom erhöhen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung vorstehender HBV-Vektoren. In einem solchen Verfahren wird der Defekt in der selbständigen Replikation eines erfindungsgemäßen HBV-Vektors überwunden, indem dieser in Zellen transfiziert wird, die funktionelle HBV-Proteine exprimieren. Die Expression der HBV-Proteine kann transient und/oder stabil sein, wobei eine stabile Expression bevorzugt ist. Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden HBV-Vektoren als DNA-Moleküle wie auch als Virus-Partikel bereit-

gestellt.

Zur Herstellung vorstehender Zellen können übliche Verfahren verwendet werden. Günstig ist es, Hepatomzellen, z.B. Hep G2-Zellen (vgl. Knowles, B.B. et al., Science 209, (1980), 497-499), mit Expressionsplasmiden zu transfizieren, die für funktionelle HBV-Proteine codieren. Besonders günstig ist es, wenn die Gene für die einzelnen funktionellen HBV-Proteine auf verschiedenen Expressionsplasmiden vorliegen.

Zur Herstellung vorstehender Expressionsplasmide erweist es sich als günstig, übliche, Selektionsmarker aufweisende HBV-Vektoren zu verwenden und in diesen den für die Verpackung notwendigen Epsilon-Bereich sowie unterschiedliche funktionelle HBV-Gene zu deletieren. Die DNA-Sequenz von HBV, einschließlich des Epsilon-Bereiches, ist bekannt (vgl. z.B. Fujiyama, A. et al., Nucl. Acids Res. 13, (1983), 4601-4610; Polack, J.R. und Ganem, D., J. Virol. 67, (1993), 3254-3263).

Für die Transfektion von Hepatomzellen, z.B. Hep G2-Zellen, mit vorstehenden Expressionsplasmiden können übliche Verfahren verwendet werden. Für eine transiente Expression der funktionellen HBV-Proteine eignet sich z.B. ein DEAE-Dextranverfahren (vgl. McCutchan, J.H. und Pagano, J.S., J. Natl. Cancer Inst. 41, (1968), 351-357), während für eine stabile Expression z.B. ein Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren (vgl. Graham, F.L. und van der Eb, A.J., Virology, 52 (1973), 456-467), zu nennen ist. Es werden Zellen erhalten, die funktionelle HBV-Proteine exprimieren. Solche Zellen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Von diesen werden solche bevorzugt, welche die Polymerase, die Oberflächenantigene und die Capsidproteine von HBV exprimieren, insbesondere stabil exprimieren.

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein Gentransfersystem bereitgestellt, das leberzellspezifisch ist und sich für eine Gentherapie, insbesondere eine in vivo Gentherapie eignet. Das Gentransfersystem umfaßt HBV-Vektoren und Zellen, in

denen diese Vektoren bereitgestellt werden können.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, Fremd-DNA in Leberzellen zu übertragen und dort zu exprimieren. Damit eröffnet sie nicht nur Möglichkeiten zur Behandlung monogener Stoffwechseldefekte, z.B. familiäre Hypercholesterinämie, Hyperamönamie, Hyperbilirubinämie, Phenylketonurie, α_1 -Antitrypsinmangel, Hämophilie, etc., sondern auch zur Therapie multifaktorieller Erkrankungen, wie der Virushepatitiden, z.B. HBV, HCV, HDV, und nicht zuletzt des primären Leberzellkarzinoms.

Des weiteren gibt die vorliegende Erfindung die Möglichkeit, die Leber als Bioreaktor zur Sezernierung beliebiger therapeutischer Proteine ins Blut zu benutzen. Dadurch ergeben sich neue Aspekte in der Gentherapie, die weit über das ursprüngliche Zielorgan hinausgehen, wie beispielsweise die Therapie von malignen Erkrankungen, von Virusinfektionen oder allgemein von Erkrankungen, welche sich nicht in der Leber manifestieren.

Darüberhinaus ist es mit der vorliegenden Erfindung möglich, verschiedenste Verfahren zur Abtötung von Viren in entnommenen Körperflüssigkeiten, z.B. Blut, zu monitoren. Hierzu kann ein erfindungsgemäßer, mit einem Minotor-Gen versehener HBV-Vektor der Körperflüssigkeit vor Beginn des Verfahrens zugegeben und dann in gewissen Zeitabständen bestimmt werden.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens als Reagens für Diagnose und/oder Therapie.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Die Figur zeigt die DNA-Sequenz eines erfindungsgemäßen HBV-Vektors, pHBV/V1. Diese DNA-Sequenz umfaßt folgendes:

Nukleotidnr.	Elemente
3262-3272	"direct repeat II" von HBV
3496-3504	"direct repeat I" von HBV
3519-3579	Epsilon-Bereich von HBV
3694-3748	"multiple cloning site"
3962-3970	"direct repeat II" von HBV
4196-4204	"direct repeat I" von HBV
4288-4293	Poly A - Region

Die übrigen Nukleotide umfassen solche des Klonierungsvektors pSPT 19 (vgl. Beispiel 1).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Konstruktion eines erfindungsgemäßen HBV-Vektors, pHBV/V1

Aus dem Plasmid pBRHBadr4 (vgl. Fujiyama, A. et al., vorstehend), das einen HBV Subtyp, adr 4, enthält, wurde ein 621 bp langes BamHI/Stu I-Fragment von adr 4 herausgeschnitten und in den mit BamHI/Sma I geöffneten Klonierungsvektor pSPT 19 (vgl. Katalog von Boehringer Mannheim, Bestellnr. 909815) inseriert. Es wurde das Plasmid pSPT 0.2x HBV erhalten. Dieses Plasmid enthält alle für die HBV-Replikation notwendigen, regulatorischen Elemente der E_{II}/C_p -Region. In pSPT 0.2x HBV wurde an der BamHI-Restriktionsstelle ein komplettes 3215 bp langes HBV-Genom (BamHI/BamHI-Fragment) von pBRHBadr4 (vgl. vorstehend) eingesetzt. Es wurde das Plasmid pSPT 1.2x HBV erhalten. In diesem Plasmid liegen die vorstehenden, regulatorischen Elemente der E_{II}/C_p -Region am 5'Ende und auch am 3'-Ende des HBV-Anteils vor. Ferner wurde in den X-ORF (vgl. vorstehend) von pSPT 1.2x HBV eine ochre Mutation im Codon 8 eingefügt. Es wurde das Plasmid pSPT 1.2x HBV Mx erhalten. Dieses Plasmid wurde mit StuI und NcoI (Schnittstellen im HBV-Genom) gespalten und die funktionellen Gene von HBV wurden entfernt. Stattdessen wurde eine "multiple cloning site" eingefügt. Es wurde ein erfindungsgemäßer HBV-Vektor, pHBV/V1, erhalten.

Beispiel 2: Expression einer Fremd-DNA in einem erfindungsgemäßen HBV-Vektor, pHBV/V1

In die "multiple cloning site" of pHBV/V1 von Beispiel 1 wurde eine bekannte Fremd-DNA inseriert. Dies war das Luciferase-Gen bzw. das LacZ-Genfragment. Im ersten Fall wurde das Plasmid pV1/HBV-Luc und im zweiten das Plasmid pV1/HBV-LacZ erhalten. Beide Plasmide wurden zu einer transienten Transfektion von HepG2-Zellen (vgl. vorstehend) verwendet.

Es zeigte sich, daß beide Fremd-DNAs exprimiert wurden. Dies ist auch ein Nachweis für die Replikation von pHBV/V1 in Zellen, die HBV-WT-Partikel produzieren.

Patentansprüche

1. HBV-Vektor, bei dem funktionelle Gene von HBV zumindest teilweise deletiert sind.
2. HBV-Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ferner das Gen für den Transaktivator von HBV mutiert oder teilweise bzw. vollständig deletiert ist.
3. HBV-Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV deletiert sind und das Gen für den Transaktivator von HBV mutiert ist.
4. HBV-Vektor nach Anspruch 3, hinterlegt bei der DSM unter DSM 9947.
5. Verfahren zur Bereitstellung eines HBV-Vektors nach Anspruch 3, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
 - (a) Transfektion von Zellen mit dem HBV-Vektor nach Anspruch 3, wobei die Zellen die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV exprimieren, und
 - (b) Isolierung des in (a) erhaltenen HBV-Vektors.
6. Zellen, exprimierend die Polymerase, die Oberflächenproteine und die Capsidproteine von HBV.
7. Verwendung des HBV-Vektors nach Anspruch 1 als Reagens für Diagnose und/oder Therapie.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Therapie eine in vivo Gentherapie ist.

Fig. 1

1 TATAGTGTCA CCTAAATCGT ATGTGTATGA TACATAAGGT TATGTATTAA
51 TTGTAGCCGC GTTCTAACGA CAATATGTAC AAGCCTAATT GTGTAGCATC
101 TGGCTTACTG AAGCAGACCC TATCATCTCT CTCGTAAACT GCCGTCAGAG
151 TCGGTTTGGT TGGACGAACC TTCTGAGTTT CTGGTAACGC CGTCCCGCAC
201 CCGGAAATGG TCAGCGAACC AATCAGCAGG GTCATCGCTA GCCAGATCCT
251 CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCGGCATCAC CGGCGCCACA GGTGCGGTTG
301 CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG GGAAGATCG GGCTCGCCAC
351 TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCGGCGTG GGTATGGTGG CAGGCCCCGTG
401 GCCGGGGGAC TGTGGGGCGC CATCTCCTTG CATGCACCAT TCCTTGCGGC
451 GGCGGTGCTC AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC CTAATGCAGG
501 AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CGATATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT
551 CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
601 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT
651 GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTCACCG TCATCACCGA
701 AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT
751 GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA
801 TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT
851 ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA
901 AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT
951 TGCGGCATT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG
1001 TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
1051 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT
1101 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC
1151 GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG
1201 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG
1251 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA
1301 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
1351 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
1401 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC
1451 CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACTGG CGAACTACTT
1501 ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT
1551 TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG

1601 ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG
1651 GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG
1701 TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT
1751 CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT
1801 TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT
1851 CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC
1901 ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT
1951 TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC
2001 AGCGGTGGTT TGTTCGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG
2051 TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG
2101 CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT
2151 CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT
2201 GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG
2251 TCGGGCTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC
2301 CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC
2351 TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAAGCG CAGGGTCGGA
2401 ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA
2451 TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT
2501 GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT
2551 TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC
2601 GTTATCCCTT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG
2651 ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG
2701 GAAGCGGAAG AGCGCCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG
2751 TATTTACAC CCGATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC TCTGATGCCG
2801 CATAGTTAAG CCAGTATATA CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT
2851 GGCTGCGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT
2901 GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC
2951 TGCATGTGTC AGAGGTTTTT ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCCAG
3001 CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC CAAGCTTGCA
3051 TCCCTGCAGG TCGACTCTAG AGGATCCTGC GCGGGACGTC CTTTGTCTAC
3101 GTCCCGTCGG CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCGTCTCGGG GCCGTTTGGG
3151 ACTCTACCGT CCCCTTCTTC ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGCGCA
3201 CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC CTTCTCATCT GCCGGTCCGT

3251 GTGCACTTCG CTTACCTCT GCACGTCGCA TGGAGACCAC CGTGAACGCC
3301 CACCAGGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC
3351 GATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAGG
3401 ACTGGGAGGA GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTACTAGGA
3451 GGCTGTAGGC ATAAATTGGT CTGTTACCA GCACCATGCA ACTTTTTCAC
3501 CTCTGCCTAA TCATCTCATG TTCATGTCCT ACTGTTCAAG CCTCCAAGCT
3551 GTGCCTTGGG TGGCTTTGGG GCATGGACAT TGACCCGTAT AAAGAATTG
3601 GAGCTTCTGT GGAGTTACTC TCTTTTTTGC CTTCTGACTT CTTTCCTTCT
3651 ATTCGAGATC TCCTCGACAC CGCCTCAGCT CTATATCGGG AGGcctgcgg
3701 ccgctcgagt taactagtcg cgatgcatcg atgatcaccg gggccatgGC
3751 TGCTAGGGTG TGCTGCCAAC TGGATCCTGC GCGGGACGTC CTTTGTCTAC
3801 GTCCCGTCGG CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCGTCTCGGG GCCGTTTGGG
3851 ACTCTACCGT CCCCTTCTTC ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGCGCA
3901 CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC CTTCTCATCT GCCGGTCCGT
3951 GTGCACTTCG CTTACCTCT GCACGTCGCA TGGAGACCAC CGTGAACGCC
4001 CACCAGGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC
4051 GATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAGG
4101 ACTGGGAGGA GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTACTAGGA
4151 GGCTGTAGGC ATAAATTGGT CTGTTACCA GCACCATGCA ACTTTTTCAC
4201 CTCTGCCTAA TCATCTCATG TTCATGTCCT ACTGTTCAAG CCTCCAAGCT
4251 GTGCCTTGGG TGGCTTTGGG GCATGGACAT TGACCCGTAT AAAGAATTG
4301 GAGCTTCTGT GGAGTTACTC TCTTTTTTGC CTTCTGACTT CTTTCCTTCT
4351 ATTCGAGATC TCCTCGACAC CGCCTCAGCT CTATATCGGG AGGGGGTACC
4401 GAGCTCGAAT TCCGTGTATT C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00807

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/86 C07K14/02 C12N5/08 C12N5/10 A61K48/00 A61K39/29		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,91 16420 (GEN HOSPITAL CORP) 31.Oktober 1991	1,6,7
Y	siehe das ganze Dokument ---	2-5
X	WO,A,90 02176 (UNIV YALE ; FOX CHASE CANCER CENTER (US)) 8.März 1990 siehe das ganze Dokument ---	1
Y	J MED VIROL, MAR 1995, 45 (3) P247-52, UNITED STATES, XP002009355 UCHIDA T ET AL: "Complete nucleotide sequences and the characteristics of two hepatitis B virus mutants causing serologically negative acute or chronic hepatitis B." siehe das ganze Dokument ---	2-5
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25.Juli 1996		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 09. 08. 96
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gurdjian, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00807

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>VIROLOGY, NOV 15 1994, 205 (1) P314-20, UNITED STATES, XP002009356 SUGATA F ET AL: "Analysis of the X gene promoter of woodchuck hepatitis virus." siehe das ganze Dokument -----</p>	2-5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE96/00807

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl sich die Ansprüche 8 und 7 teilweise -sofern sie eine "In-Vivo"-Methode betreffen- auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründet sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00807

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9116420	31-10-91	AU-B- 656136	27-01-95
		AU-B- 7785891	11-11-91
		CA-A- 2081022	21-10-91
		EP-A- 0528903	03-03-93

WO-A-9002176	08-03-90	AU-B- 4315689	23-03-90
		EP-A- 0380656	08-08-90
